

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

DIALOG(R) File 347:JAPIO  
(c) 1999 JPO & JAPIO. All rts. reserv.

04831376

METHOD OF CLEANING MICROBE AND WATER OR SOIL

PUB. NO.: 07-123976 [J P 7123976 A]  
PUBLISHED: May 16, 1995 (19950516)  
INVENTOR(s): SHIBUYA KATSUTOSHI  
KOJIMA TOSHIICHI  
APPLICANT(s): SHIMIZU CORP [000229] (A Japanese Company or Corporation), JP  
(Japan)  
APPL. NO.: 05-273877 [JP 93273877]  
FILED: November 01, 1993 (19931101)  
INTL CLASS: [6] C12N-001/20; A62D-003/00; C02F-003/34; C12N-001/20;  
C12R-001/05  
JAPIO CLASS: 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry); 28.1  
(SANITATION -- Sanitary Equipment); 28.9 (SANITATION --  
Other); 32.2 (POLLUTION CONTROL -- Waste Water Treatment)

ABSTRACT

PURPOSE: To provide new microbes which belong to *Alcaligenes eutrophus*, having ability to decompose trichloroethylene, capable of decomposing trichloroethylene contained in water or soil within several days, thus useful for cleaning water or soil.

CONSTITUTION: Black chalk soil native to Isehara City, Kanagawa Prefecture, Japan, is exposed for a long time to a contaminated water containing artificially prepared trichloroethylene, part of the soil is then put into a vial followed by addition of an inorganic medium, trichloroethylene and toluene and then stoppering the vial. The resultant system is subjected to shaking culture at 30 deg.C, the trichloroethylene level in the vapor phase in the vial is analyzed by gas chromatography; a flat plate medium is then coated with the soil of the test system where trichloroethylene decay is found, and a culture of the colony developed is repeated, thus obtaining the objective new microbes having ability to decompose trichloroethylene such as *Alcaligenes eutrophus* KS01 (FERM P-13761).

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-123976

(43)公開日 平成7年(1995)5月16日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/20		A 7236-4B		
		D 7236-4B		
		F 7236-4B		
A 6 2 D 3/00	Z A B	9234-2E		
C 0 2 F 3/34	Z A B Z			

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 5 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平5-273877	(71)出願人	000002299 清水建設株式会社 東京都港区芝浦一丁目2番3号
(22)出願日	平成5年(1993)11月1日	(72)発明者	渋谷 勝利 東京都港区芝浦一丁目2番3号 清水建設株式会社内
		(72)発明者	児島 敏一 東京都港区芝浦一丁目2番3号 清水建設株式会社内
		(74)代理人	弁理士 柳田 良徳 (外3名)

(54)【発明の名称】 微生物および水または土壌の浄化方法

(57)【要約】

【目的】 トリクロロエチレンを効率よく分解できる微生物を提供することを目的としている。

【構成】 トリクロロエチレン分解能を有するアルカリジェネス エウロトロフス (*Alcaligenes eurtrophus*)  
FERM P-13761。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 アルカリジェネス エウロトロフス (*Alcaligenes eutrophus*) に属し、トリクロロエチレン分解能を有する微生物。

【請求項2】 前記微生物が、アルカリジェネス エウロトロフス (*Alcaligenes eutrophus*) KS01 (FERM P-13761) 株である請求項1に記載の微生物。

【請求項3】 請求項1若しくは請求項2に記載の微生物をトリクロロエチレンに汚染された水または土壤に接種・混合して、これら水または土壤に含まれたトリクロロエチレンを分解処理する水または土壤の浄化方法であって、前記水または土壤に前記微生物を接種・混合するに際して、少なくとも一種以上の芳香族化合物を添加混合することを特徴とする水または土壤の浄化方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、トリクロロエチレンを効率よく分解する微生物およびそれを用いた水または土壤の浄化方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 周知のように、先端産業において洗浄剤等として使用されるトリクロロエチレンによる地下水や土壤の汚染が指摘されており、発癌性の疑いのあるトリクロロエチレンの処理方法が早急に求められている。

【0003】 これまで、トリクロロエチレンに汚染された地下水の処理方法として、真空吸引法やエアーストリッピング法などの物理的処理を行うことによりトリクロロエチレンを分離する方法が提案されている。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、これらの方法では、大気汚染防止等の二次汚染を防止する観点から、活性炭処理等の二次処理を必要とするが、係る処理を施しても、完全には除去できないのが現状である。

【0005】 一方、近年、トリクロロエチレンを微生物によって極めて効率よく分解し無害化するいわゆる生物浄化法に関する研究が進められている。この生物浄化法は、微生物の分解機能を用いるため、上記の物理的処理方法に比べて多大なエネルギーを必要とせず、二次汚染を招来することなく、しかも、原位置での広範囲にわたった処理が可能である等のバイオ技術の利点を備えた優れた方法である。

【0006】 本発明は、上記の観点よりなされたものであり、トリクロロエチレンを効率よく分解できる微生物を提供することを目的としている。また、本発明は、ト\*

$K_2HPO_4$	1.0 g、	$KH_2PO_4$	1.0 g
$NH_4NO_3$	1.0 g、	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
$Fe_2(SO_4)_3$	5 mg、	$Na_2MoO_4 \cdot H_2O$	5 mg
$MnSO_4 \cdot H_2O$	5 mg、	酵母エキス	5 mg

【0012】 そして、ガスクロマトグラフによる分析結果によりトリクロロエチレン分解能の特に強い菌株を単

リクロロエチレンに汚染された水または土壤を二次汚染を招来することなく、効率よく浄化することができる水または土壤の浄化方法を提供することを目的としている。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明に係る微生物は、アルカリジェネス エウロトロフス (*Alcaligenes eutrophus*) に属し、トリクロロエチレン分解能を有することを特徴とするものである。

【0008】 また、本発明に係る水または土壤の浄化方法は、請求項1若しくは請求項2に記載の微生物をトリクロロエチレンに汚染された水または土壤に接種・混合してこれら水または土壤に含まれたトリクロロエチレンを分解処理する水または土壤の浄化方法に係り、前記水または土壤に前記微生物を接種・混合するに際して、少なくとも一種以上の芳香族化合物を添加混合することを特徴としている。

## 【0009】

【作用】 本発明に係る微生物は、芳香族化合物の存在下、水や土壤中において、トリクロロエチレンを分解する。したがって、この微生物をトリクロロエチレンに汚染された水又は土壤に接種・混合する際に、少なくとも一種類以上の芳香族化合物を添加混合することによって、安全かつ確実にトリクロロエチレンを分解除去することができる。

## 【0010】

【実施例】 以下、本発明の実施例を添付図面を参照しながら詳細に説明する。本発明に係る微生物は、人工的に調整したトリクロロエチレンを含有する汚染水に伊勢原市産黒ボク土を長時間暴露させ、土壤の一部をバイアル瓶に入れ、これに下記組成 (培地1リットルあたり) の無機培地、所定量のトリクロロエチレンおよびトルエンを添加し、テフロンコートブチルゴムで栓をした後アルミキャップでシールし、30℃で振盪培養し、一定時間経過後、倍ある瓶内の気相をガスクロマトグラフで分析し、トリクロロエチレンの減衰が見られる試験系について土壤量を希釈しながら集積を繰り返して、LB (Luria-Bertani) プロスに寒天を加えた平板培地に塗布し、出現するコロニーの培養を繰り返して単離したものである。なお、微生物の培養には、上記のLBプロスをはじめ、トリプトソイブロス (Trypticase soy broth) 等任意に至適条件を選択してこれを行なうことが可能である。

## 【0011】

離し、その形態学および生理学的性質を調べたところ以下に示すような結果が得られた。

【0013】

## (a) 形態

- ①細胞の形状 短桿菌  
 ②大きさ 1.  $1 \times 1.6 \mu\text{m}$   
 ③コロニーの性状 乳白色、発育旺盛 (LB寒天培地にて)

## (b) 培養的性質

マッコンキー寒天培地上の育成 +

## (c) 生理学的性質

- ①グラム染色性 +  
 ②硝酸還元能 +  
 ③インドールの生成 -  
 ④オキシダーゼ試験 +  
 ⑤ウレアーゼ -  
 ⑥クエン酸の利用 +  
 ⑦炭素源資化性

デキストロース (好気条件下) -、デキストロース (嫌気条件下) -  
 マルトース -、サッカロース -  
 デンプン -、D-キシロース -

## (d) その他

フェニルアラニンの脱アミノ反応 -  
 アルギニンの分解 -  
 リジンの脱炭酸反応 -  
 オルニチンの脱炭酸反応 -  
 ONPG -

脂肪酸組成	14:0	2.49%
	14:0 2OH	3.85%
	16:1	35.70%
	16:0	20.72%
	18:1	27.11%

【0014】以上の結果から、単離されたトリクロロエチレン分解能の高い菌株は、アルカリジェネス エウロトロフス (*Alcaligenes eutrophus*) KS01であることが判明した。

【0015】なお、この微生物は、寄託番号 FERM P-13761にて工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている。

【0016】この微生物は、培地に混入した50ppm程度の比較的高濃度のトリクロロエチレンを完全に資化、分解する。この微生物によりトリクロロエチレンを分解させる際には、トリクロロエチレンを含む培地 (培地、土壌、水等) 中にトルエン等の芳香族化合物を少なくとも一種類添加する必要がある。ここで用いられる芳香族化合物としては、トルエン、フェノール、 $\alpha$ -クレゾール、 $m$ -クレゾール等が用いられる。

【0017】以下、本発明に係る微生物を、下記の実験例によりさらに詳しく説明する。

## 実験例1

容積68mlのバイアル瓶に上記無機培地15mlを入れ、培養液中の濃度として、100ppmのトルエンと、トリクロロエチレンとして、0.1~50ppmとなるように

調整する。そして、これにLBブロスで培養し遠沈洗浄した本微生物を $10^8$ 個/ml (培地) 接種した後、テフロンコートブチルゴム栓をし、アルミキャップでシールしたものを30℃で培養し、定期的に気相をECD検出器付きガスクロマトグラフで分析した。

【0018】この結果を図1に示す。同図に示したように、培養液中の0.1~50ppm濃度のトリクロロエチレンは、5日以内に前記ガスクロマトグラフの検出限界以下となり、本微生物が極めて高いトリクロロエチレン分解能を有することが確認された。

## 【0019】実験例2

容積68mlのバイアル瓶に上記無機培地15mlを入れ、培養液中の濃度として、1ppmとなるように、トリクロロエチレンを添加した。これに、トルエン1~100ppm、フェノール1ppmまたはフェノール10ppmを滴下し、これにLBブロスで培養し遠沈洗浄した本微生物を $10^8$ 個/ml (培地) 接種した後、テフロンコートブチルゴム栓をし、アルミキャップでシールしたものを30℃で培養し、実験例1と同様に、定期的に気相をECD検出器ガスクロマトグラフで分析した。

【0020】図2は、この結果を示したものであり、同

図に示すように、全ての条件下で本微生物を接種後3日程度で、トリクロロエチレンが前記ガスクロマトグラフの検出限界以下に分解されることが確認された。なお、図には示していないが、トルエンに代えて、1若しくは10ppmのメタクレゾールまたはオルトクレゾールを混合した場合にも、本微生物によってトリクロロエチレンが確実に分解されることが確認された。

#### 【0021】実験例3

容積68mlのバイアル瓶に前述の無機培地15mlを入れ、培養液中の濃度として、1ppmとなるようトリクロロエチレンを添加し、これにトルエン10ppmを滴下し、これにLBブロスで培養し遠沈洗浄した本微生物を10<sup>9</sup>個/ml(培地)になるように接種した後、テフロンコートブチルゴム栓をし、アルミキャップでシールしたものを30℃で培養し、1日後気相をトリクロロエチレンの場合にはECD検出器付ガスクロマトグラフで、トルエンの場合には、FID検出器付ガスクロマトグラフで分析した。

【0022】図3は、この結果を示したものであり、同図に示すように、本微生物によって、トリクロロエチレンが分解されるとともに、添加混合したトルエンも消失していることが確認され、環境汚染物質であるトルエンによる環境汚染の心配がないことも確認された。

【0023】次に、本発明に係る微生物を用いたトリクロロエチレンに汚染された土壌の浄化方法に関する実験例について説明する。

#### 実験例4

容積124mlのバイアル瓶に伊勢原市黒ボク土(生土)を10g(乾燥土)を入れるとともに、トリクロロエチレンを0.1ppmまたは1ppm含有する上記無機培地を20ml入れた後、これにさらにトルエンを10ppm滴下し、LBブロスで培養し遠沈洗浄した本微生物を10<sup>9</sup>個/ml(培地+生土)接種した後、テフロンコートブチルゴム栓をして懸濁状態にし、さらにアルミキャップでシールしたものを30℃で培養し、定期的に気相をECD検出器付ガスクロマトグラフで分析した。

【0024】図4は、その結果を示すものであり、トリ

クロロエチレンエチレン濃度が0.1ppmの場合には3日で、1ppmの場合にも10日以内に前記ガスクロマトグラフの検出限界以下に分解され、本微生物が自然環境下でもトリクロロエチレン分解機能を発揮することが確認された。これによって、滅菌状態の培養液中では効果を示すが、自然界では土着の微生物に駆逐されてその分解能を発揮できないことが多い既往の微生物にあって、本微生物が、自然環境下でもその分解機能を十分に発揮することから、汚染された水と接触させることにより、また、汚染された土壌を本微生物を含む水と懸濁状態にするなどしてこれらを浄化することが可能である。

#### 【0025】

【発明の効果】本発明に係る微生物によれば、少なくとも一種以上の芳香族化合物の存在下において、水または土壌に含まれるトリクロロエチレンを数日以内に分解することができる。

【0026】本発明に係る水または土壌の浄化方法によれば、多大なエネルギーを必要とせず、また、二次汚染の発生を抑えることができる等のバイオ技術の利点が得られるほか、自然環境下においてトリクロロエチレンに汚染された水または土壌を工業的規模で効率良く浄化することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

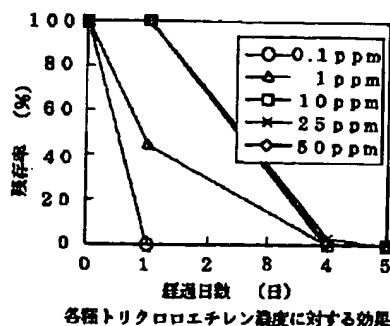
【図1】本発明に係る微生物の各種トリクロロエチレン濃度における分解効果を示す実験結果である。

【図2】本発明に係る微生物の分解効果を芳香族化合物の種類およびその濃度を变化させた場合について調べた実験結果である。

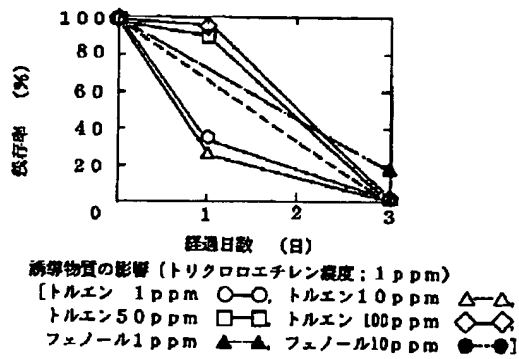
【図3】本発明に係る微生物のトリクロロエチレンの分解能およびトルエンの残存量を示す実験結果であり、(a)はトリクロロエチレンの初期ピーク、(b)は一日経過後のトリクロロエチレンのピーク、(c)はトルエンの初期ピーク、(d)は一日経過後のトルエンのピークである。

【図4】本発明に係る微生物を汚染土壌に適用した場合の分解効果を示す実験結果である。

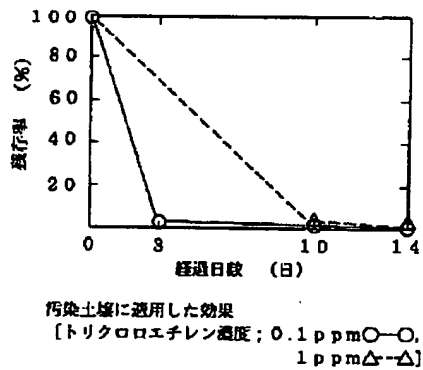
【図1】



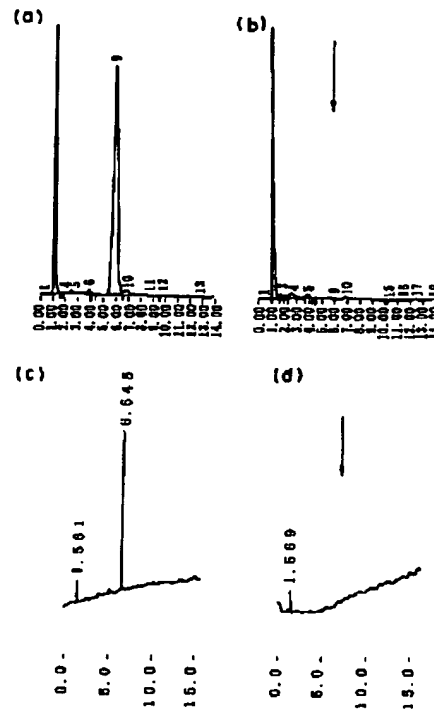
【図2】



【図4】



【図3】



トリクロロエチレンおよびトルエンのガスクロマトグラフ

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

/(C12N 1/20

C12R 1:05)